

m 898-02

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12P 7/64

//(C12P7/64, C12R

1:645)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97198403.4

[43]公开日 1999 年 10 月 20 日

[11]公开号 CN 1232507A

[22]申请日 97.8.27 [21]申请号 97198403.4

[30]优先权

[32]96.8.30 [33]JP [31]230210/96

[86]国际申请 PCT/JP97/02989 97.8.27

[87]国际公布 WO98/08967 日 98.3.5

[85]进入国家阶段日期 99.3.30

[71]申请人 三得利株式会社

地址 日本大阪府

[72]发明人 东山坚一 秋元健吾 清水昌

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 陈永良

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 含不饱和脂肪酸油脂的制造方法

[57]摘要

含不饱和脂肪酸油脂的制造方法,其特征是,在含有从大豆中得到的氮源的培养基中培养属于被孢霉(Mortierella)属被孢霉(Mortierella)亚属微生物、然后从该培养物中提取含不饱和脂肪酸油脂。得到 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇含有率少的油脂。

ISSN 1000-8-4274

权 利 要 求 书

1. 含不饱和脂肪酸油脂的制造方法, 其特征是, 在含有从大豆得到的氮源的培养基中培养属于被孢霉属被孢霉亚属的微生物、然后从该培养物中提取含不饱和脂肪酸油脂。
2. 权利要求 1 记载的制造方法, 其特征是上述从大豆得到的氮源, 除去水分的成分中的氮含量的重量比在 2% 以上。
3. 权利要求 1 或 2 记载的制造方法, 其特征是上述从大豆得到的氮源至少是从脱脂大豆、未脱脂大豆、以及对这些大豆进行过加工的产品中选择出的一种至少以上的氮源。
4. 权利要求 3 记载的制造方法, 其特征是上述对脱脂或未脱脂大豆实施的加工包括通过热处理; 酸处理; 碱处理; 酶处理; 化学修饰; 或者包括上述处理的化学的和/或物理的处理在内的变性和/或再生; 利用水和/或有机溶剂除去一部分成分; 通过过滤和/或离心分离除去一部分成分; 冷冻; 粉碎; 干燥; 和/或筛分等工序。
5. 权利要求 1 或 2 记载的制造方法, 其特征是上述从大豆得到的氮源是对脱脂大豆至少实施了热变性的氮源。
6. 权利要求 1~5 中任一项记载的制造方法, 其特征是上述培养物是通过菌体培养制造油脂过程中的培养液或灭过菌的该培养液、培养结束后的培养液或是灭过菌的该培养液、或者是从培养过程中收集的培养菌体或干燥的该菌体。
7. 权利要求 1~6 任一项记载的制造方法, 其特征是使用槽对上述微生物进行液体通气培养。
8. 权利要求 7 记载的制造方法, 其特征是上述槽是通气搅拌槽或空气升液器培养槽。
9. 权利要求 7 或 8 记载的制造方法, 其特征是从培养开始至少 3 天内, 通过一边维持葡萄糖浓度在 0.3% 以上和/或葡萄糖平均浓度 0.5% 以上一边进行培养。
10. 权利要求 7~9 任一项记载的制造方法, 其特征是: 培养的天数为

2-20天。

11. 权利要求 1-10 任一项记载的制造方法，其特征是：上述不饱和脂肪酸是 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、和/或蜜得酸。
12. 含花生四烯酸油脂，其特征是：24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比例在 35% 以下，而且花生四烯酸的含量是 20-54%。
13. 含花生四烯酸油脂，其特征是：24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比例对 24-脱氢胆固醇之比在 1.2 以下、而且花生四烯酸的含量是 20-54%。
14. 含花生四烯酸油脂，其特征是：24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇的组成比例在 35% 以下，24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比例对 24-脱氢胆固醇之比在 1.2 以下、而且花生四烯酸的含量是 20-54%。
15. 权利要求 12-14 任一项记载的含花生四烯酸油脂，其特征是：该油脂是从属于被孢霉属被孢霉亚属微生物得到的微生物油。
16. 配有权利要求 12-15 任一项记载的含花生四烯酸油脂的营养辅助食品。
17. 配有权利要求 12-15 任一项记载的含花生四烯酸油脂的早产儿用调和奶、婴儿用调和奶、幼儿用食品、或孕产妇用食品。
18. 配有权利要求 12-15 任一项记载的含花生四烯酸油脂的动物饲料。

说 明 书

含不饱和脂肪酸油脂的制造方法

本发明涉及利用属于被孢霉 (*Mortierella*) 属被孢霉 (*Mortierella*) 亚属微生物制造含不饱和脂肪酸油脂的方法, 该油脂中 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇 (24,25-Methylenecholest-5-en-3 β -ol) 含有率少。

人们知道 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属微生物可以作为生产花生四烯酸、二高(Dihomo)- γ -亚麻酸、二十碳五烯酸等不饱和脂肪酸的微生物, 利用这种微生物已经开发出通过发酵法高效制造花生四烯酸、二高- γ -亚麻酸、二十碳五烯酸的方法 [特开昭 63-44891、特开昭 63-12290、特开昭 63-14696、特开平 5-91887、特开昭 63-14697]。利用对属于 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属微生物实施变异处理获得的 $\Delta 12$ 不饱和活性低下或缺失的变异株制造蜜得酸(mead 酸, 5,8,11-二十碳三烯酸)的方法人们也已经了解了 (特开平 5-91888)。

另外, 二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、蜜得酸等不饱和脂肪酸是具有很强且多种生理活性的前列腺素、凝血噁烷、前列环素、白三烯等分子的前体物质, 添加了这些前体物质的食品以及动物饲料正受到人们的关注。

例如, 花生四烯酸虽然是具有使子宫收缩或松弛作用、扩张血管、降低血压作用等生理活性的前列腺素、凝血噁烷、前列环素、白三烯等分子的前体物质, 但近年来, 作为婴儿发育的必需成分, 花生四烯酸与二十二碳六烯酸 (以下也称之 DHA) 一起研究进展很快。

据 Lanting (《柳叶刀》LANCET, Vol.344.1319-1322(1994)) 等人报道, 对出生后 3 周以上母乳哺育的婴儿和用婴儿奶粉喂养的婴儿进行跟踪调查, 直到 9 岁为止, 从行为方面研究脑神经的小的障碍发生率, 发现用婴儿奶粉喂养的婴儿的脑障碍发生率是母乳哺育的婴儿的 2 倍。人们推测这一惊人的结果可能是由于母乳中存在而婴儿奶粉中几乎不存在的 DHA 或花生四烯酸等高度不饱和脂肪酸与脑的发育有关系。除此之外,

高度不饱和脂肪酸与新生儿的脑以及网膜的发育有关系的结果陆续有报道。

然而，虽说是含这些不饱和脂肪酸的油脂安全性很高，但由于有微生物产生的问题，所以并没有充分渗透于社会，而且据《脂类》LIPIDS、Vol.27、No.6、481 - 483 (1992) 报道，*Mortierella alpina* 1S-4 株中还产生直到现在还未发现天然存在的 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇。因此人们期待着可安全地用于食品和动物饲料的、来自 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属微生物的含不饱和脂肪酸油脂的开发。

本发明目的在于提供能够安心用于食品或动物饲料的，而且能够经济且稳定供给不饱和脂肪酸的微生物油。

本发明人等为了解决上述课题，探索高效制造 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇含量少，而含不饱和脂肪酸油脂的方法，详细地研究了各种培养基成分与甾醇组成的关系，结果发现在 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属微生物的培养中，通过使用从大豆得到的氮源，可以得到 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比小的油脂。由此完成了本发明。

就是说，本发明是有关含不饱和脂肪酸油脂的制造方法的发明，发明涉及在含有从大豆获得的氮源的培养基中培养 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属微生物，以及从该培养物中提取含不饱和脂肪酸油脂等过程。

本发明中所谓的不饱和脂肪酸是指碳数在 16 以上，且含有一个以上双键的脂肪酸，而一般将碳数在 18 以上且含有 2 个以上双键的脂肪酸称之为高度不饱和脂肪酸，例如 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、蜜得酸等。

本发明中所谓的 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属微生物是指长孢被孢霉 *Mortierella elongata*、微小被孢霉 *Mortierella exigua*、喜湿被孢霉 *Mortierella hygrophila*、高山被孢霉 *Mortierella alpina* 等微生物，具体讲是指长孢被孢霉 *Mortierella elongata* IFO8570、微小被孢霉 *Mortierella exigua* IFO8571、喜湿被孢霉 *Mortierella hygrophila* IFO5941、高山被孢霉 *Mortierella alpina* IFO8568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、

CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68 等菌株。

这些菌株中的任一种都可以从大阪市财团法人发酵研究所 (IFO)、以及美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 和真菌菌种保藏中心 [Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)] 无限制地得到。也可以使用本发明人从土壤中分离的菌株 *Mortierella elongata* SAM0219 (微工研菌寄第 8703 号)。这些属于模式菌种的菌株或从自然界中分离的菌株可以直接使用, 也可以使用与进行过一次以上增殖和/或分离后得到的原来菌株性质不同的自然变异菌株。

本发明使用的微生物包括按照在使用同样的培养基培养时, 与原来的野生株产量相比, 油脂中不饱和脂肪酸含量多, 或总油脂量多, 或者是不饱和脂肪酸含量和总油脂量都多的意图设计的属于 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属的微生物 (野生株) 的变异株或重组株。

本发明使用的微生物也包括按照能有效利用费用优越的培养基, 生产出与相应野生株等量的不饱和脂肪酸的意图设计的菌株。例如, 作为 $\Delta 12$ 不饱和活性缺失的变异株的 *Mortierella alpina* SAM1861 (微工研条寄第 3590 号、FERM BP - 3590) 或作为 $\Delta 5$ 不饱和活性缺失的变异株的 *Mortierella alpina* SAM1860 (微工研条寄第 3589 号、FERM BP - 3589)。

上述属于 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属的微生物可以用它的孢子、菌丝、或预培养得到的前培养液接种于液体培养基或固体培养基上培养。作为碳源可以使用常用的葡萄糖、果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、糖蜜、甘油、甘露糖醇、柠檬酸、玉米淀粉等中的任一种, 优选的碳源是葡萄糖、麦芽糖、果糖、玉米淀粉、甘油、柠檬酸。

而在本发明中, 通过使用从大豆得到的营养源作为氮源, 可以使油脂中的 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比变小。

本发明中使用的从大豆得到的氮源中的氮含量希望占在除去水分之后重量的 2% 以上, 优选的是占 3% 以上, 更优选的是占 5% 以上。而作为从大豆得到的氮源可以使用脱脂大豆或是对脱脂大豆进行热处理、酸处理、碱处理、酶处理、以及通过包括热处理、酸处理、碱处理、酶处理、化学修饰等化学的和/或物理的处理在内的变性和/或再生; 利用水和/或有

机溶剂除去一部分成分；通过过滤和/或离心分离除去一部分成分；实施冷冻；粉碎；干燥；筛分等加工的、或者是对未脱脂大豆实施同样加工后的产品，可以单独使用或组合使用上述加工的产品。一般常用的是大豆、脱脂大豆、豆饼、食用大豆蛋白、豆腐渣、豆乳、黄豆粉等大豆制品。特别是对脱脂大豆实施热变性的制品，更理想的是对脱脂大豆实施热变性后又除去乙醇可溶性成分的制品。

除此之外，根据需要，在对甾醇组成没有很大影响的范围内，可以配合使用其它的氮源，例如可以使用蛋白胨、酵母提取液、麦芽提取液、肉提取液、酪蛋白氨基酸、玉米浸渍液、尿素等有机氮源，以及硝酸钠、硝酸铵、硫酸铵等无机氮源的一种或数种。

另外，根据需要也可以使用微量的营养源，例如可以使用磷酸钾、磷酸二氢钾等磷酸盐、硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁、硫酸铁、硫酸铜、氯化镁、氯化钙等无机盐类以及维生素等。

同时在本发明中，通过在培养基中添加作为目的不饱和脂肪酸的基质进行培养，也可以促进该不饱和脂肪酸的积蓄。作为不饱和脂肪酸的基质，如十六碳烷或十八碳烷那样的碳氢化合物；象油酸或亚麻酸那样的脂肪酸或它们的盐，例如它们的钠盐或钾盐，或脂肪酸酯，例如乙酯、甘油脂肪酸酯、山梨聚糖脂肪酸酯；或者是象橄榄油、大豆油、菜籽油、棉籽油或椰子油那样的油脂类，这些物质可以单独或组合使用。基质的总添加量为培养基重量的 0.001~10%、优选的是 0.5~10%。而即使使用这些基质作为唯一的碳源进行培养也可以。

上述的碳源、氮源、无机盐类、维生素和/或添加物可以添加到培养开始前的培养基和/或培养过程中的培养液中。这些培养基成分可以一次添加，或连续添加，或随时间分几次添加。这些培养基成分可以分别单独添加，或预先混合后添加。这些培养基的成分只要是对菌的生长没有妨碍，其浓度并没有特别限制。实用中，一般希望碳源为培养基重量的 0.1~30%、优选 1~15%，氮源为 0.01~10%、优选 0.1~5%。

培养温度为 5~40℃、优选 20~30℃、也可以在 20~30℃ 培养使菌体增殖后，再于 5~20℃ 继续培养使菌体生产不饱和脂肪酸。通过这样的温

度控制可以提高生成脂肪酸中的高度不饱和脂肪酸的产率。将培养基的 pH 调到 4~10、最好是 5~8，进行通气搅拌培养、振荡培养、或静置培养。通常培养 2~20 天、理想的是培养 5~20、最好是培养 5~15 天。

尤其是使用象通气搅拌培养槽或空气升液器培养槽那样的槽，通过液体通气培养，可以以可能达到商品化收率生产含不饱和脂肪酸的油脂。而这种情况下，从培养开始至少 3 天内，通过一边维持葡萄糖浓度在 0.3% 以上和/或葡萄糖平均浓度 0.5% 以上、理想的是葡萄糖浓度为 0.5% 以上和/或葡萄糖平均浓度为 0.7% 以上、最好是葡萄糖的浓度为 0.5~5% 和/或葡萄糖平均浓度 0.7~3%，一边进行培养，可以更有效地制造含不饱和脂肪酸的油脂。例如，每 1 克干菌体制造的花生四烯酸在 10mg 以上，理想状况可以达到 120mg 以上。

这样一来，菌体内大量积蓄着目的不饱和脂肪酸含量丰富的，而 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇含量少的油脂。

作为目的油脂可以从通过菌体培养制造油脂过程中的培养液或其灭菌的培养液、或是从培养完了时的培养液或其灭菌的培养液、或是从各个过程中收集的培养菌体或其干燥菌体，利用常规方法得到。

从培养菌体 通过下面的方法可以提取目的油脂。

培养结束后，通过离心分离和/或过滤等常用的固液分离手段得到菌体。培养菌体最好是积蓄进行、破碎、干燥。干燥可以通过冷冻干燥、风干进行。干燥菌体最好是在氮气流下用有机溶剂进行萃取。作为有机溶剂可以使用乙醚、己烷、甲醇、乙醇、氯仿、二氯甲烷、石油醚等，而通过甲醇和石油醚交互萃取或使用氯仿-甲醇-水溶剂萃取也可以得到良好的结果。

通过在减压下从萃取物中蒸馏掉有机溶剂，可以得到高浓度的含不饱和脂肪酸油脂。取代上述方法，使用湿菌体也可以进行萃取。这种情况下，使用甲醇、乙醇等对水相溶性的溶剂，或使用与其它溶剂组成的对水相溶性的混合溶剂。其它的工序与上述的一样。

上述提取过程得到的油脂中，不饱和脂肪酸是以结合为甘油三酯和磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇中的状态存在的，几乎是以甘油

三酯形式存在的。为了从培养物中提取的含不饱和脂肪酸油脂中分离纯化出含不饱和脂肪酸的甘油三酯，利用常规方法，经己烷萃取后进行脱酸、脱色、除臭、去胶处理、或冷却分离等。

本发明所谓的 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比是利用甾醇组成分析方法按照下面过程求得的。

首先说明甾醇组成分析方法。将原料油脂 30~80mg 称量于带有栓塞的试管内，然后添加甲醇 4ml 和 33% 氢氧化钾水溶液 1ml，并加上栓塞。将该试管于 80℃ 边搅拌边使其反应一小时，然后放置冷却，用正己烷萃取脂溶成分。对得到的正己烷萃取液进行水洗，洗至酚酞指示剂对水相不显色为止，通过减压浓缩获得分析样品。将分析样品溶解于少量的正己烷中，供下表记载的条件进行气相色谱分析用。通过与市售的 24-脱氢胆固醇标准样品比较气相色谱，进行 24-脱氢胆固醇峰的鉴定。

在保留时间为 24-脱氢胆固醇的 0.8~2.0 倍期间检测的成分是甾醇成分，利用常规方法求出保留时间内的所有甾醇成分的气相色谱峰的面积。各个峰面积相对于该成分总面积的总和的比例就作为各成分的组成比。例如 24-脱氢胆固醇检测峰的面积相对于所有甾醇面积的总和的比例就作为 24-脱氢胆固醇的组成比。24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇在保留时间为 24-脱氢胆固醇保留时间的 1.07~1.12 倍时被检测出来。24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇检测峰的面积相对于所有峰面积的总和的比例就作为 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇的组成比。

使用的柱子 ULBON HR-1 (内径 0.25mm、长 25m)

柱温 280℃

注入口和检测器温度 300℃

载体气体和表压 氮气 1.2kg/cm²

组成气体及流量 氮气 70ml/min

检测器 FID

分流比: 20

本发明的含不饱和脂肪酸油脂中 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇的组成比在 35% 以下，比较好的在 33% 以下，最好的在 30% 以下。和/或该 24,25-

甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇对同样油脂中存在的 24-脱氢胆固醇之比在 1.2 以下, 优选在 0.9% 以下, 更优选在 0.6% 以下。所谓的 24-脱氢胆固醇是与 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇一起存在于通过培养 *Mortierella* 属 *Mortierella* 亚属的微生物得到的油脂中的成分, 也存在于母乳中。

作为本发明的含不饱和脂肪酸油脂的一个例子, 例如, 含花生四烯酸的油脂, 其中花生四烯酸占油脂中总脂肪酸重量的 20~54%、优选占 30~50%, 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇的组成比在 35% 以下、优选在 33% 以下、更优选在 30% 以下, 和/或该 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇对同样油脂中存在的 24-脱氢胆固醇之比在 1.2 以下, 优选在 0.9% 以下, 更优选在 0.6% 以下。

而该含花生四烯酸油脂具有的油脂特性是: 甘油三酯含量在 90% 以上、水分在 0.1% 以下、酸值在 0.5 以下、过氧化值在 5 以下、油脂颜色, 于罗维邦比色法 133.4mm 比色杯中黄色在 50 以下、红色在 10 以下, 脂肪酸组成、花生四烯酸为 20~54%、优选占 30~50%、肉豆蔻酸为 0.2~0.7%、棕榈酸为 10~16%、硬脂酸为 4~10%、油酸为 5~15%、亚油酸为 5~15%、 γ -亚麻酸为 1~5%、 α -亚麻酸为 0.1~2%、二高- γ -亚麻酸为 1~6%、二十碳五烯酸为 0~1%、二十四碳(烷)酸为 2~7%。

该油脂富含以甘油三酯形式存在的花生四烯酸、可能不含有二十碳五烯酸、即使含有由于是极微量, 用作食品、特别是用作早产儿用调制奶、婴儿用调制奶、幼儿用食品、或用作孕产妇用食品的原料都是很理想的。而本发明的含不饱和脂肪酸油脂由于饮食经验还不知道的 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇含有率少, 所以可以安心地用于食品和动物饲料。

以下, 通过实施例具体说明本发明。

实施例 1

使用 *Mortierella elongata* IFO8570 作为花生四烯酸生产菌, 将含有葡萄糖 2%、食用大豆蛋白(商品名: エスサンミート、味之素公司制造) 1%、菜籽油 0.1% 的培养基 1400L 加入 2000L 通气搅拌培养槽中、于温度 28℃、通气量 1.0vvm、搅拌 80rpm、槽内压 1.0kg/cm²G 的条件下开始通气搅拌培养。按照流加法维持葡萄糖浓度 1.5%、培养 7 天后、通过

过滤回收菌体、提取油脂。而作为比较例子、用 1% 酵母提取液代替食用大豆蛋白，进行同样的培养和油脂的提取。

按照前述的程序分析得到的油脂中的甾醇成分，在保留时间 9.6 分钟附近检测出 24-脱氢胆固醇、而在保留时间 7.2 分钟附近检测出 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇。结果如表 1 所示。得到了 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比少的含不饱和脂肪酸油脂。

表 1

	24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比 (A)	24-脱氢胆固醇组成比 (B)	A / B	总甾醇量*	花生四烯酸含量**
实施例	30%	65%	0.46	1%	8%
比较例	65%	27%	2.41	1%	9%

* 油脂中甾醇含量

**花生四烯酸对油脂中总脂肪酸的含有率

实施例 2

使用 *Mortierella alpina* CBS754.68 作为花生四烯酸生产菌，将含有葡萄糖 4%、黄豆面 1.3%、酵母提取液 0.2%、橄榄油 0.1% 的培养基 600L 加入 1000L 通气搅拌培养槽中、于温度 24℃、通气量 1.0vvm、搅拌 100rpm、槽内压 0.5kg/cm²G 的条件下进行 5 天的通气搅拌培养。然后通过过滤、干燥回收菌体、通过己烷萃取得到油脂。而作为比较例子、使用葡萄糖 4%、酵母提取液 1.5%、橄榄油 0.1% 的培养基，通过同样的培养得到油脂。另外，实施例、比较例在培养的第二天都流加 1% 葡萄糖。

按照前述的程序分析得到的油脂中的胆固醇成分，在保留时间 10.2 分钟附近检测出 24-脱氢胆固醇、而在保留时间 11.2 分钟附近检测出 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇。结果如表 1 所示。得到了 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比少的含不饱和脂肪酸油脂。

表 2

	24,25-甲叉胆甾 -5-烯-3 β -醇组 成比 (A)	24-脱氢胆固 醇组成比 (B)	A/B	总甾醇量*	花生四烯酸 含量**
实施例	25%	53%	0.47	1.2%	48%
比较例	68%	16%	4.25	1.1%	46%

* 油脂中甾醇含量

**花生四烯酸对油脂中总脂肪酸的含有率

实施例 3

使用 *Mortierella alpina* ATCC32221、*Mortierella alpina* ATCC42430 作为花生四烯酸生产菌，分别进行培养。将含有葡萄糖 4%、脱脂大豆粉 1.2%、磷酸氢钾 0.2%、大豆油 0.1% 的培养基 25L 加入 50L 通气搅拌培养槽中、于温度 28℃、通气量 1.0vvm、搅拌 300rpm、槽内压 1.0kg/cm²G 的条件下进行 5 天的通气搅拌培养。然后通过过滤、干燥回收含有花生四烯酸的菌体、从回收的菌体通过己烷萃取得到油脂。

而作为比较例子、使用葡萄糖 4%、啤酒酵母粉末 1.2%、磷酸氢钾 0.2%、菜籽油 0.1% 的培养基，通过同样的培养得到油脂。另外，实施例、比较例在培养的第二天都流加 1% 葡萄糖。按照前述的程序分析得到的油脂中的胆固醇组成。表 3 给出了分析的结果。得到了 24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比少的含不饱和脂肪酸油脂。

表 3

	24,25-甲叉胆甾- 5-烯-3 β -醇组成 比少 (A)	24-脱氢胆固 醇组成比 (B)	A / B	总胆固 醇量*	花生四烯酸含量 **
Mortierella alpina ATCC32221	5%	67%	0.07	0.9%	25%
比较例	37%	28%	1.32	0.8%	20%
Mortierella alpina ATCC42430	5%	35%	0.14	0.9%	18%
比较例	40%	25%	1.60	1.0%	18%

* 油脂中甾醇含量

**花生四烯酸对油脂中总脂肪酸的含有率

实施例 4

使用 *Mortierella alpina* CBS754.68 作为花生四烯酸生产菌，将含有葡萄糖 2%、大豆蛋白 1.5%、大豆油 0.1% 的培养基 1400L 加入 2000L 通气搅拌培养槽中、于温度 24℃、通气量 1.0vvm、搅拌 80rpm、槽内压 200kPa 的条件下开始通气搅拌培养。按照流加法维持葡萄糖浓度 0.5%、培养 7 天后、通过过滤回收菌体。将菌体干燥后、用己烷萃取、萃取液进行脱色、除臭、添加 0.05% 的作为氧化剂的生育酚。分析得到的油脂，其组成如下。

分析结果

甘油三酯含量 95.6%

水分 0.04%

酸值 0.08

过氧化值 2.16

油脂颜色 (罗维邦比色法 133.4mm 比色杯) 黄色: 20.1、红色: 1.4

脂肪酸组成

花生四烯酸 44.4%

十四烷酸为 0.6%

软脂酸 14.6%

硬脂酸 8.8%

油酸 6.3%

亚油酸 10.2%

γ -亚麻酸 3.2%

α -亚麻酸 0.8%

二高- γ -亚麻酸 5.2%

二十碳五烯酸为 0.2%

二十四碳(烷)酸 4.8%。

总甾醇含量 1.0%

24,25-甲叉胆甾-5-烯-3 β -醇组成比 24%

24-脱氢胆固醇组成比 67%

实施例 5

将实施例 4 得到的含花生四烯酸油脂和鱼油以及植物油适当地混合, 得到必需脂肪酸调和油脂。除了该必需脂肪酸调和油脂外, 每当调制育儿用奶粉 100kg 时, 准备如下所示的原材料和成分。然后按照常规方法将这些原材料溶解、混合、清洗后、进行灭菌、浓缩、调匀、喷雾干燥之后就得到育儿用调制奶粉。

原材料及成分

酪蛋白 5.6kg

ホエイ蛋白质浓缩物 24.0kg

必需脂肪酸调和油脂 25.0kg

(主要含有亚油酸、 α -亚麻酸)

作为花生四烯酸	80g
作为二十二碳六烯酸	25g
作为二十碳五烯酸	10g
糖(乳糖和寡糖)	43.4kg
矿物质和维生素	2kg
<hr/>	
合 计	100kg

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.